

医研第302号


(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

論 文 題 目

**Lamina propria c-kit<sup>+</sup> immune precursors reside in human adult intestine and differentiate into natural killer cells**

(ヒト成人の腸管粘膜固有層には c-kit 陽性の免疫担当細胞の前駆細胞が存在し、それらの細胞はナチュラルキラー細胞へと分化する)

氏名 知念 寛 




近年の研究により、マウスの腸管粘膜には、胎仔ではリンパ組織誘導細胞、成獣ではクリプトパッチ細胞と呼ばれる、lineage marker 陰性、c-kit 陽性 ( $\text{lin}^- \text{c-kit}^+$ ) の免疫担当細胞の前駆細胞が存在する事が知られている。しかしながらヒトの腸管にこのような細胞が存在するかについてはこれまで明らかにされてはいなかった。今回我々は、ヒト成人の腸管粘膜内にも  $\text{lin}^- \text{c-kit}^+$  細胞が存在していることを腸管粘膜の免疫染色と腸管粘膜より分離したリンパ球のフローサイトメトリーによる解析によって明らかにした。これらの細胞はマウスとは異なり腸管粘膜固有層内にまばらに存在し、パッチの形成は認めなかった。フローサイトメトリーによる解析では、これらの細胞は CD34、CD38、CD33 を発現しており造血幹細胞に近い未分化な細胞と考えられた。更にこれらの細胞は IL-2R $\alpha$ 、CD44、IL-7R $\alpha$  などを発現しており、表面抗原の発現パターンは T/NK 共通前駆細胞と酷似していた。また、RT-PCR による解析で

は、NK細胞の分化において重要な役割を果たすとされる Id2、PU.1、SpiB1 などの転写因子が胸腺細胞と比較して高発現していた。一方、T細胞の分化に重要な RAG-1、RAG-2、pre-TCR $\alpha$  鎖の発現は胸腺細胞と比して著しく低値であった。この lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> 細胞を *in vitro* で培養したところ、その多くは CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>c-kit<sup>dim</sup> の未熟NK細胞と考えられる細胞へと分化した。我々は、この lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> より培養分化させたNK細胞をヒト成人の末梢血中、腸管粘膜固有層中、腸管上皮間中のNK細胞と比較した。培養分化させたNK細胞は末梢血中の多くを占める CD56<sup>dim</sup>NK細胞とは表面抗原の発現や、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などのサイトカイン産生能、および細胞傷害活性の程度などで異なっていたが、腸管内のそれとはほぼ一致していた。腸管内のNK細胞の性格は末梢血中の CD56<sup>dim</sup>NK細胞より CD56<sup>bright</sup>NK細胞に近いと考えられたが Integrin  $\alpha_E$  や CD83 などの表面抗原は腸管内のNK細胞でのみ発現していた。この lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> 細胞を RAG-2KO マウスに移植すると、これらの

細胞はマウス腸管粘膜に生着したが、マウス生体内ではNK細胞へは分化しなかった。マウス腸管より分離したヒト  $lin^{-}c-kit^{+}$  細胞をヒトサイトカイン ( IL-2 、 IL-15 ) 存在下で培養するとNK細胞へと分化した。このことから、  $lin^{-}c-kit^{+}$  細胞は腸管指向性のNK細胞の前駆細胞で、その分化にはヒトサイトカインの存在が必要であると考えられた。我々は更に腸管内NK細胞と炎症性腸疾患との関連について検討した。クローン病では健常コントロールおよび潰瘍性大腸炎に比べ腸管内のNK細胞が増加していること、そして腸管でのNK細胞の分化が亢進していることを明らかにした。このことから、クローン病のTh1型の免疫反応において腸管内のNK細胞の産生する  $IFN-\gamma$  や  $TNF-\alpha$  が病態形成に関与していることが示唆された。以上のことから、ヒト成人の腸管粘膜は独立したNK細胞の分化の場であり、腸管内のNK細胞は粘膜免疫の恒常性維持に関与していると考えられた。

(別紙様式第7号)

## 論文審査結果の要旨

報告番号	* <u>課程博</u> 論文博	第 号	氏 名	知念 寛
論文審査委員	審査日	平成 19年 12月 20日		
	主査教授	田中勇悦 		
	副査教授	渡部久実 		
	副査教授	西巻正 		
(論文題目)				
Lamina propria c-kit <sup>+</sup> immune precursors reside in human adult intestine and differentiate into natural killer cells.				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に関して、研究にいたる背景と目的、研究内容、および研究成果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
近年の研究により、マウスの腸管には、lineage marker 陰性、c-kit 陽性 (lin <sup>-</sup> c-kit <sup>+</sup> ) の免疫担当細胞の前駆細胞が存在する事が知られていた。しかしながら、ヒトの腸管に同様の細胞が存在するかについてはこれまで明らかにされていなかった。このような背景の下、本研究は、ヒト成人の腸管粘膜に免疫担当細胞の前駆細胞が存在するのか、また存在するのであれば、どのような細胞へと分化しているのかを解明することを目的としている。				
2. 研究内容				
今回の研究で、ヒト成人の腸管粘膜内にも lin <sup>-</sup> c-kit <sup>+</sup> 細胞が存在していることが明らかとなった。これらの細胞の表面抗原の発現は T/NK 共通前駆細胞と酷似していた。また、RT-PCR による解析では、NK 細胞の分化において重要な役割を果たす Id2、PU. 1、SpiB1 などの転写因子が胸腺細胞と比較して高発現していた。				

この  $lin^- c-kit^+$ 細胞を *in vitro* で培養したところ、その多くは  $CD3^- CD56^+ c-kit^{dim}$  の未熟NK細胞と考えられる細胞へと分化した。また、 $lin^- c-kit^+$ 細胞より培養分化させたNK細胞をヒト成人の末梢血中、腸管粘膜固有層中、腸管上皮間中のNK細胞と比較したところ、培養分化させたNK細胞は末梢血中のそれとは表面抗原の発現やサイトカイン産生能及び細胞傷害活性の程度などで異なっていたが、腸管内のそれとはほぼ一致していた。

$lin^- c-kit^+$ 細胞をRAG-2KOマウスに移植すると、マウス腸管粘膜に生着したが、NK細胞へは分化しなかった。移植後のマウス腸管より分離したヒト  $lin^- c-kit^+$ 細胞をヒトサイトカイン存在下で培養するとNK細胞へと分化した。

更に本研究では、腸管内NK細胞と炎症性腸疾患との関連について検討し、クローン病では腸管内のNK細胞が増加していること、そして腸管内でのNK細胞の分化が亢進していることを明らかにした。

### 3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究は、ヒト成人の腸管粘膜が独立したNK細胞の分化の場であることを明らかにしたはじめての報告である。また、腸管粘膜に存在するNK細胞の性格について、詳細に検討し、それがクローン病患者の腸管粘膜で増加していることを明らかにし、クローン病の病態形成への関与の可能性について言及したはじめての報告でもある。

本研究は、ヒトの腸管粘膜免疫機構の解明の上で重要な研究であり、かつ、その研究成果は国際的にも認められた高水準のものであると評価された。

以上により、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
  - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。